



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

**Análise de Variações Genômicas em Genes da Região
Cromossômica 22q11.2 em Pacientes Esquizofrênicos do
Estado do Pará**

LEOPOLDO SILVA DE MORAES

Belém

Agosto – 2015

LEOPOLDO SILVA DE MORAES

**Análise de Variações Genômicas em Genes da Região
Cromossômica 22q11.2 em Pacientes Esquizofrênicos do
Estado do Pará**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular.

Orientador: Profº Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano

Belém
Agosto – 2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Moraes, Leopoldo, 1967-

Análise de variações genômicas em genes da região cromossômica 22q11.2 em pacientes esquizofrênicos do estado do Pará / Leopoldo Moraes. - 2015.

Orientador: Rommel Burbano;

Coorientador: Giovanny Pinto.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2015.

1. Esquizofrenia. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Genes. I. Título.

CDD 23. ed. 616.898

INTITUIÇÕES COLABORADORAS

Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Laboratório de Citogenética e Humana da Universidade Federal do Pará

Fundação Hospital de Clinicas Gaspar Viana - FHCGV

Este projeto tem orçamento aprovado para financiamento pela Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado do Pará - FAPESPA.

O presente projeto tem consentimento aprovado no comitê de ética em pesquisa
da Fundação Hospital de Clinicas Gaspar Viana - FHCGV, como comprovado nos

ANEXOS.

**Dedico este trabalho aos
meus filhos, que são minha
inspiração para a vida e no
trabalho, Anderson,
Vanessa e Marco Antônio
eu amo vocês.**

Léo

"Queria ter nascido cego, surdo e mudo, não ter uma perna, diabético ou até mesmo adquirido AIDS, mas nunca queria ter desenvolvido essa doença, essa tal de Esquizofrenia, me perdoe meu Deus se estou pecando morrerei sem lhe perdoar por ter me dado esse mal.."

Paciente FHCGV

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder saúde e resignação para enfrentar as dificuldades encontradas no caminho.

Aos meus pais, Raimunda e Orlando, que mesmo não estando mais presente aqui, mas deixaram um legado inigualável de valores morais e éticos no qual eu me espelho para o cumprimento de meus afazeres pessoais e profissionais. Saudades eternas.

Ao Anderson, Vanessa e Marco Antônio, meus filhos que são minhas molas propulsoras. A minha família, que sempre acreditou em mim.

Ao meu Amigo e orientador Rommel, que com sua eterna sapiência e paciência me concedeu este sonho, “meu tio muito obrigado”

Aos meus amigos, Adriana, David, Marcelo, Plínio, pelo eterno acolhimento no Laboratório.

Um agradecimento em especial ao casal de amigos Giovanny e Keiko, pela colaboração direta na realização deste trabalho, mas também pelas hospedagens em sua residência na Parnaíba-PI.

A Todos aqueles que tiveram uma parcela de contribuição nesta pós-graduação deixo o meu “muito obrigado”

A todos Muito Obrigado!

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Gerais	1
1.2 Epidemiologia da Esquizofrenia	2
1.3 Teorias Etiológicas	3
1. 3. 1 Teoria Genética	4
1. 3. 2 Teorias Neuroquímicas - A Hipótese Dopaminérgica	6
1. 3. 3 Alterações Estruturais - Hipótese do Desenvolvimento Neural.	6
1.4 Diagnóstico	7
1. 3.1 Sub Tipos de Esquizofrenia	7
1. 5. 1 Esquizofrenia Paranóide	7
1. 5. 2 Esquizofrenia Desorganizada	7
1. 5. 3 Esquizofrenia Catatônica	8

1. 5. 4 Esquizofrenia Indiferenciada	8
1. 5. 5 Esquizofrenia Residual	8
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3 Aspectos Éticos	10
CAPÍTULO – ARTIGO CIENTÍFICO	
Abstract	12
Introduction	12
Materials and Methods (Tissue samples)	13
Study participants	13
Genotyping	14
Statistical analysis	14
Results	14
Discussion	15
References	20
7. Considerações Finais	31

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

33

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** Características clínicas e sociodemográficas dos participantes do estudo.
- TABELA 2** Distribuição dos genótipos do polimorfismo *COMT* Val158Met entre pacientes e controles.
- TABELA 3** Distribuição dos genótipos do polimorfismo *ZDHHC8* rs175174 em pacientes e controles.
- TABELA 4** Médias da idade de início e resultados do teste ANOVA para frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos *COMT* Val158Met e *ZDHHC8* rs175174 entre pacientes com esquizofrenia.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Aberração Cromossômica
AP	antipsicóticos
COMT	<i>Catecol-O-Metil-Transferase</i>
DNA	Ácido desoxirrinonucleico
DSM	Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais
ESQ	Esquizofrenia
IC	Intervalo de confiança
KB	(kbp) = <i>kilo</i> (quilo) pares de bases = 1.000 bp
MET	Metionina
ORs	<i>odds ratios</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (polimorfismo de fragmento de restrição)
SNC	Sistema Nervoso Central
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
VAL	Valina
ZDHC8	<i>Zinc Finger DHHC Domain-Containing Protein 8.</i>
χ^2	teste do Qui-quadrado

RESUMO

Os polimorfismos *COMT* Val158Met e *ZDHHC8* rs175174 têm recebido papel de destaque no estudo molecular da esquizofrenia não apenas por estarem localizados no principal *locus* de suscetibilidade da doença, 22q11, mas também por relacionarem-se, respectivamente, ao estado dopaminérgico do córtex pré-frontal e à atividade de diversas proteínas em células neuronais. Para avaliar a influência dos genótipos polimórficos na esquizofrenia, genotipamos por PCR em tempo real 130 pacientes e 175 controles de uma população do Norte do Brasil. Nossos resultados indicaram uma ausência de associação entre ambos os polimorfismos com a chance de esquizofrenia na população estudada. Todavia, quando categorizada por sexo, encontramos uma associação dicotômica entre o genótipo Met/Met do polimorfismo *COMT* Val158Met e a suscetibilidade à esquizofrenia, conferindo uma chance maior da doença em homens (OR = 10,76; IC 95% = 2,09–55,34; $p = 0,004$) que em mulheres (OR = 0,23; IC 95% = 0,07–0,69; $p = 0,009$). Além disso, a análise de variância revelou uma associação dos genótipos Val/Met (*COMT* Val158Met) e GG (*ZDHHC8* rs175174) com maiores médias de idade de início da esquizofrenia. Nosso estudo suporta a hipótese de associação dependente de gênero do polimorfismo *COMT* Val158Met com a esquizofrenia, além de apontar uma influência de ambos os polimorfismos estudados com a idade de início da doença.

Palavras-Chave: Esquizofrenia; *COMT*; *ZDHHC8*; Polimorfismos; Idade de início; Gênero.

ABSTRACT

The COMT Val158Met and ZDHHC8 rs175174 polymorphisms have received increased attention in the molecular study of schizophrenia not only because they are localised to the main susceptibility locus of the disease, 22q11, but also because they are related to the dopaminergic status of the prefrontal cortex and the activity of several neuronal proteins, respectively. To evaluate the influence of the polymorphic genotypes on schizophrenia, we used real-time PCR to genotype 130 patients and 175 controls in a population from the North Region of Brazil. Our results indicated an absence of association between both polymorphisms and the likelihood of schizophrenia in the population studied. However, when categorised by gender, we found a dichotomous association between the Met/Met genotype of the COMT Val158Met polymorphism and susceptibility to schizophrenia, conferring a higher probability of disease in men (OR = 10.76; CI 95% = 2.09–55.34; $p = 0.004$) than in women (OR = 0.23; CI 95% = 0.07–0.69; $p = 0.009$). Moreover, the variance analysis showed an association of the genotypes Val/Met (COMT Val158Met) and GG (ZDHHC8 rs175174) with higher average age at onset of schizophrenia. Our study supports the hypothesis of a gender-dependent association of the COMT Val158Met polymorphism with schizophrenia, in addition to suggesting an influence of both polymorphisms studied on the age at disease onset.

Keywords: Schizophrenia; COMT; ZDHHC8; Polymorphisms; Age at onset; Gender.

1 INTRODUÇÃO

Considerações Gerais

A esquizofrenia (ESQ), embora seja discutida como uma doença única, hoje por se caracterizar por perturbações na cognição, emoção, pensamento, percepção e comportamento, já é considerada uma síndrome de etiologia heterogênea que inclui um grupo de pacientes com apresentação clínica, respostas aos tratamentos e curso da doença muito variado (KAPLAN e SADOCK, 2012).

A magnitude do problema da esquizofrenia atraiu a atenção de figuras importantes da psiquiatria e da neurologia ao longo da história, com destaque para Emil Kraepelin (1896-1926) e Eugen Bleurer (1857-1939). Antes deles, Benedict Morel (1809 – 1873), um psiquiatra francês, aplicara o termo *Démence précoce* para pacientes deteriorados cuja doença havia se iniciado na adolescência. Karl Ludwig Kahlbaum (1828-1899) descreveu os sintomas da catatonía. Ewald Haker (1843-1909), por sua vez, ateu-se ao comportamento bizarro de pessoas com hebefrenia (KAPLAN e SADOCK, 2007).

A ideia de uma alteração biológica como agente causador da esquizofrenia é tão antiga quanto a definição desta doença como entidade nosológica. Kraepelin (1896- 1926), ao sistematizar os diagnósticos psiquiátricos, agrupou a então chamada *Dementia Praecox* dentro do grupo das demências endógenas.

Retratos literários, tais como o da Loucura de Orestes, na *Orestéia* de Ésquilo, ou Murmúrios do Pobre Tom, no *Rei Lear*, deixam claro que as psicoses graves são reconhecidas até mesmo pelos leigos há muitos anos. Descrições mais técnicas aparecem em livros como *Discoveries of Witchcraft* (Descoberta da Bruxaria), de Reginald Scors do século XVI ou nos textos de Pinel no século XVIII (ANDREASEN, 1995).

A descrição dos sintomas atualmente conhecidos como de esquizofrenia são oriundos dos estudos de Emil Kraepelin, *Dementia Praecox and Paraphrenia*, publicados em 1919, que descreviam a demência precoce e a psicose maníaco-depressiva. Entretanto foi Eugen Bleurer em 1911 que cunhou o termo "esquizofrenia", divisão da mente, mente fendida ou dividida, para o transtorno caracterizado pela perda da associação entre os processos de pensamento e entre pensamento, emoção e comportamento (KAPLAN e SADOCK, 2007). Alzheimer foi o primeiro a conduzir estudos neuropatológicos e não observou gliose reativa, diferenciando os processos neuropatológicos envolvidos na esquizofrenia das demências senis (BOGERTS, 1999).

A ESQ é uma doença psiquiátrica severa com etiologia complexa e multifatorial, que apresenta diversas dimensões psicopatológicas incluindo sintomas positivos (delírios e alucinações), desorganização (desagregação do pensamento), sintomas negativos (distanciamento afetivo, bulimia, alogia), déficits cognitivos (prejuízo da memória, atenção e funções executivas), agressividade e hostilidade, sintomas depressivos e ansiedades e risco de suicídio (ANDREASEN, 1995).

Esta patologia é um transtorno psicótico maior (ou um grupo de transtornos) que usualmente aparece na fase mais tardia da adolescência ou no início da idade adulta. Apesar das técnicas modernas de tratamento, a ESQ ainda representa uma enorme sobrecarga para os pacientes e seus familiares. Na maioria dos casos, há prejuízo das funções ocupacionais ou sociais, caracterizado por afastamento social, perda de interesse ou capacidade de agir na escola ou no trabalho, mudança nos hábitos de higiene pessoal ou comportamento incomum ainda na fase prodrômica (IRA, 2013).

A ESQ afeta aproximadamente 1% da população mundial e acomete homens e mulheres na mesma proporção. No Brasil é responsável pela ocupação de 30% dos leitos de instituições hospitalares e psiquiátricas (SILVA, 2006). No Estado do Pará, a quantidade de pacientes cadastrados com diagnóstico de ESQ entre 2012-2013 foi de 182 pacientes. (SUS, 2013).

A perda total ou parcial do contato com a realidade é uma característica clínica presente nos portadores de ESQ, estes pacientes costumam ver, ouvir e sentir sensações que não existem na realidade (JULIBONI et al., 2008). A disfunção ou prejuízos cognitivos já mencionados em 1896 por Emil Kraepelin, na primeira sistematização da esquizofrenia como alterações primárias da doença, apesar de hoje não ser um critério de inclusão para o diagnóstico de esquizofrenia, a conceituação atual menciona as alterações cognitivas entre os sintomas característicos da doença (JUNIOR et al, 2010).

Uma das características psicopatológicas da ESQ são as alterações cognitivas, e estas não são derivadas ou consequências de outros sintomas e não são resultantes de tratamentos com psicofármacos ou de hospitalizações (FORCHESALTO, 2014).

1.2 SINTOMATOLOGIA

Há uma grande dificuldade em compreender o porquê das manifestações clínicas psicóticas em pacientes ESQ em função da variação dos fenômenos biológicos, psicológicos e comportamentais que eles apresentam, sendo que o comprometimento cognitivo é um dos

principais sintomas, em face disso uma alternativa para compreensão destes fenômenos nosológicos, é estudar o complexo conjunto da interação gene-ambiente (LOCH, 2014).

Positivos relacionados à presença de delírios, alucinações e a desorganização do pensamento e da conduta e negativos referentes às alterações no afeto, perdas cognitivas, avolição e anedonia assim são classificados os sintomas da ESQ, demonstrado no quadro abaixo. (HANSEN, 2014).

POSITIVOS		NEGATIVOS
Psicóticos	De organização	
Alucinação	Degradação do pensamento	Embotamento afetivo
Delírios	Boqueio do pensamento	Anedonia
Alteração da consciência da atividade do eu: • roubo do pensamento • imposição do pensamento • sensações corporais impostas	Alteração da consciência da atividade do eu. • dupla orientação. • Ambitímia • ambitendências	Hipobulia Pensamento empobrecido Déficit de atenção
Alteração da consciência da identidade do eu. • Despersonalização	Sinais catatônicos • Negativismo • Obediência automática • Flexibilidade cerácea • Estereotípias • Maneirismo • Fenômeno em eco • Agitação • Estupor	
Alteração da consciência dos limites do eu. • Apropriação • Transativismo • Publicação do pensamento		

Quadro I: sintomas positivos e negativos da ESQ. Fonte: NARDI (2015)

1. 3 EPIDEMIOLOGIA

A ESQ atinge todas as classes sociais, e tem uma prevalência de 1% na população em geral, isso significa que a cada cem pessoas uma vai desenvolver a doença.

A ESQ tem igual prevalência em homens e mulheres. A idade de pico para o início dos sintomas varia em homens é de 15 a 25 anos e nas mulheres é de 25 a 35 anos (JULIBONI et al, 2008).

Este transtorno não distingue raça, gênero e classe social com incidência igual em todos os continentes. (BORELLA, 2013).

Forchersatto e Boff (2014) nos relatam dados de que, no Brasil, a esquizofrenia ocupa 30% dos leitos psiquiátricos hospitalares, ou cerca de 100 mil leitos-dia, ocupando, ainda, o segundo lugar das primeiras consultas psiquiátricas ambulatoriais (14%) e 5º lugar na manutenção do auxílio-doença. No momento, não existe prevenção específica para a esquizofrenia, desta forma, o foco está no tratamento precoce e continuado e na reabilitação ativa do paciente.

Macêdo *et al.* (2013), afirmam que a esquizofrenia, de acordo com o entendimento atual, é considerada um transtorno grave, e de grande importância clínica. Em escala mundial, atinge os valores de 0,2% e 1,5% da população mundial total, sendo a prevalência equivalente para homens e mulheres. Esses mesmos autores referem que a expectativa de vida do paciente portador de esquizofrenia é ligeiramente menor que a média, devido ao maior índice de suicídios e de pacientes esquizofrênicos, assim como morbididades e/ ou patologias recorrentes, as quais são consideradas comórbidas.

De acordo com Lima e Veloso (2012), hoje, a esquizofrenia é uma doença que desencadeia a desorganização do pensamento ou consciência, baseando-se nessas informações, pode ser considerada como a doença mental mais incapacitante, pois ela não difere a raça, o nível social, econômico ou cultural. Sua primeira crise normalmente ocorre entre os adultos jovens na faixa etária de 20 a 30 anos, podendo apresentar-se de forma brusca ou lenta.

1. 4 TEORIAS ETIOLÓGICAS

Explicar a etiopatogenia da ESQ é hoje um dos grandes desafios de diversos grupos de pesquisa na área da psiquiatria, sabe-se que fatores como variáveis biológicas específicas, tais como os fatores genéticos, bioquímicos e alterações sutis na morfologia cerebral estão diretamente envolvidos na gênese desta importante entidade nosológica, assim inúmeras são as explicações para a etiopatogênese da doença, mas ainda não são suficientes para elucidar tal patofisiologia, colocando a ESQ como uma das desordens psiquiátricas mais desafiadoras e complexas (SOUZA, 2008).

As causas ainda são desconhecidas. No entanto há consenso que várias teorias são propostas, onde destacamos: teoria Genética, Teorias Neuroquímicas: a hipótese dopaminérgica, Distúrbio do Neurodesenvolvimento, Alterações Estruturais: Teorias Psicológicas entre as quais destacamos neste trabalho as de natureza genética. (SILVA, 2006).

1. 4. 1 TEORIA GENÉTICA

Predisposição genética e os fatores mesológicos contribuem igualmente como causa desta patologia, ou seja, esse percentual gira em torno de 50% para cada um desses fatores. Os fatores genéticos e ambientais precisam ser considerados em conjunto uma vez que ambos são importantes na etiologia da esquizofrenia (GARCIA et al .2004).

A existência de maior números de casos de ESQ em certas famílias levou os pesquisadores a sugerirem que os componentes genéticos estão intimamente relacionados a etiopatogenia desta doença. (RANGEL, 2013).

Inicialmente, as expectativas eram de que as variações estruturais no DNA fossem apenas alguns milhares ao longo do genoma. Porém, nos primeiros anos do século XXI, esse número aumentou cerca de mil vezes. Em 2001, um consórcio internacional de mapeamento de polimorfismos descreveu 1.42 milhões de *loci polimórficos*. Mais importante que este grande número é a precisão de suas posições no genoma. Estima-se que exista aproximadamente um polimorfismo a cada 1,91 Kb. Isto significa que 90% das sequências de mais de 20 Kb apresentam, pelo menos, uma variação e esta densidade pode ser maior nas regiões gênicas.

Dos genes conhecidos, 93% contêm polimorfismos e 98% estão a pelo menos 5 Kb distantes de um. Logo, quase todos os genes ou regiões gênicas são marcados por uma dessas sequências variáveis (SACHIDANANDAM et al., 2001).

Por serem encontrados por todo o genoma, os polimorfismos geram alelos funcionais ou fisiologicamente relevantes, pois, em uma região codificante, podem ter impacto na proteína, em um íntron, pode influenciar no mecanismo de *splicing* e, no promotor, podem modificar a transcrição gênica (KRAWCZAK et al., 1992).

Além disso, os polimorfismos são reconhecidos como importantes ferramentas na genética humana e médica e têm sido amplamente utilizados nos estudos de associação genética de várias doenças complexas, como por exemplo: distúrbios cardiovasculares, auto-imunes, obesidade, osteoporose, diabetes, câncer e, nos caso da ESQ, psiquiátricos. Em humanos, várias análises de polimorfismos também têm sido conduzidas ao longo do genoma, na intenção de determinar os padrões dos haplótipos nas populações (para revisão, Miller & Kwok, 2001; Gabriel et al, 2002). Os dados destas análises são de extrema utilidade para o estudo das bases genéticas das doenças complexas comuns (PHILLIPS et al., 2003).

É flagrante que variações na sequência genômica contribuam para diversidade fenotípica e apontam suscetibilidade a, ou contra, qualquer tipo de doença. Deste modo,

estima-se que os riscos da maioria das doenças complexas possam ser fortemente influenciados pelos padrões polimórficos em certos genes chave de suscetibilidade, ainda a serem identificados. O mesmo raciocínio pode ser aplicado para variações interindividuais de ordem genética na resposta a medicamentos, um campo de grande interesse da indústria farmacêutica. O benefício em ter um mapa de polimorfismos é que este possibilita a cobertura de todo o genoma; portanto, os pesquisadores podem comparar os padrões e frequências das variações de seus pacientes e, desta forma, associá-los à doença em questão (LANDER et al, 2001).

A deleção 22q11.2 (Figura 1) representa o principal fator de risco conhecido para o desenvolvimento da esquizofrenia (ESQ) (GIUSTI-Rodríguez e SULLIVAN, 2013; SCHNEIDER et al., 2014). Estima-se que cerca de 25% das crianças com deleção 22q11.2 desenvolverão ESQ na adolescência ou na idade adulta, enquanto que em pacientes com ESQ não selecionados estima-se que a frequência dessa deleção seja de 1:50 a 1:100 (WILLIAMS, 2011; SQUARCIONE et al., 2013). Tal fato tem estimulado a realização de estudos moleculares em genes da região 22q11.2 na intenção de se identificar possíveis marcadores relacionados com o fenótipo da ESQ (SHIN et al., 2010; IRA et al., 2013; SQUARCIONE et al., 2013).

Os genes localizados em 22q11.2, que potencialmente podem estar envolvidos na gênese da ESQ, são relacionados ao neurodesenvolvimento e à maturação cerebral. Assim, a presença de mutações ou de alelos polimórficos específicos nesses genes poderiam determinar alterações neuroestruturais nas substâncias cinzenta e branca, importantes na fisiopatologia da ESQ (GIUSTI-Rodríguez & SULLIVAN, 2013). Por esse motivo, os genes *COMT*, *ZDHHC8*, apontam como candidatos à suscetibilidade para ESQ (SHIN et al., 2010; CLELLAND et al., 2011; JANG et al., 2013; OTA et al., 2013, MICHELOTTI et al., 2014).

O gene *COMT* (*Catecol-O-Metil-Transferase* - OMIM #116790) é um dos principais candidatos para a suscetibilidade à ESQ e codifica uma enzima envolvida na via da degradação de transmissores catecolaminérgicos de forma que a variação na sua atividade pode ter efeitos específicos no córtex pré-frontal (como, por exemplo, no mecanismo de transmissão da dopamina) e na memória de trabalho (SMITH et al., 2014).

O gene *ZDHHC8* (*Zinc Finger DHHC Domain-Containing Protein 8* - OMIM #608784) codifica uma enzima transmembrânica do tipo palmitoiltransferase que é altamente expressa no cérebro humano de adultos. A palmitoilação é um importante mecanismo no tráfego e modulação de diversas proteínas citosólicas e de membrana, especialmente em neurônios (el-Husseini Ael & Bredt, 2002). Análises de expressão em cérebros de

camundongos adultos demonstraram altos níveis de expressão dessa proteína no córtex e no hipocampo, áreas que presumivelmente desempenham um papel importante na fisiopatologia da ESQ (GIUSTI-RODRÍGUEZ & SULLIVAN, 2013).

Dada a importância dos mecanismos fisiológicos em que estão envolvidos os genes supracitados é razoável imaginar que alterações em suas estruturas, como as causadas por polimorfismos e mutações, possam interferir no seu bom funcionamento e, conseqüentemente, no surgimento de patologias associadas, como a ESQ. De fato, diversos estudos de análise de estrutura nos genes *COMT*, *ZDHHC8*, têm sido desenvolvidas na intenção de se avaliar a associação dessas variações com a suscetibilidade a ESQ (KEMPF et al, 2008; OTA et al., 2010; CHENG, 2012; WRIGHT et al., 2012; GIUSTI-RODRÍGUEZ & SULLIVAN, 2013; GOTHELF et al., 2013; JANG et al., 2013; ZARCHI et al., 2013). Por esse motivo, este estudo avaliou o papel de 2 variações genômicas (2 polimorfismos) nos genes *COMT*, *ZDHHC8*, em uma população de pacientes com ESQ do estado do Pará.

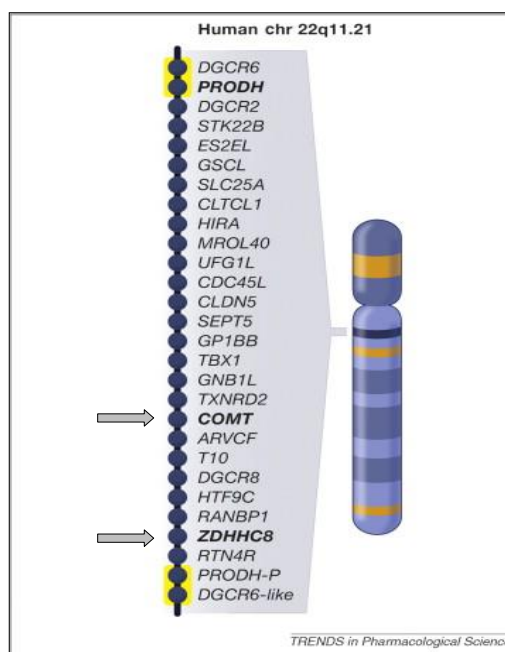


Figura: 1 – Idiograma do cromossomo 22 e os genes da região 22q11.2, modificado Karam, 2010.

1. 4. 2 TEORIAS NEUROQUÍMICAS - A HIPÓTESE DOPAMINÉRGICA

A dopamina é um importante neurotransmissor do tipo catecolaminérgico encontrado no Sistema Nervoso Central (SNC) e que regula importantes vias de sinalização através da ativação de cinco tipos de receptores (D1, D2, D3, D4 e D5). Derivada do mesmo precursor da noradrenalina e adrenalina, esta catecolamina possui ampla distribuição no Sistema Nervoso Central (SNC), sobretudo nas áreas mesocortical, nigro-estriatal, túbulo infundibular

e mesolímbica, áreas essas que tem papéis importantes na coordenação dos movimentos corporais, motivação e reforço e recompensa, emoções e comportamento e secreção de hormônios (CUPERTINO, 2014). Figura 2.

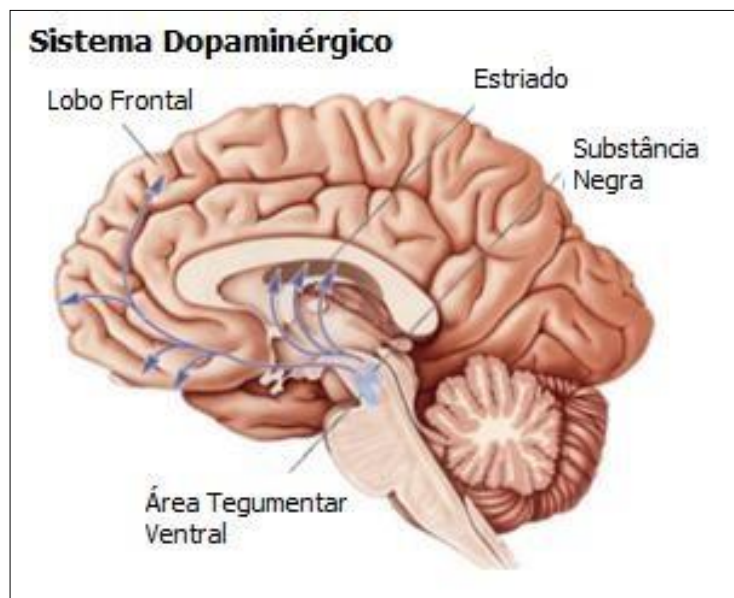


Fig. 2. Sistema Dopaminérgico Mesocorticolímbico. Adaptado de Bear, 2006

Esta hipótese surgiu com o aumento do metabolismo de dopamina devido a administração dos antipsicóticos (AP) clorpromazina e Haloperidol em camundongos, e foi reforçada pela observação de que o tratamento da psicose com Reserpina levava ao bloqueio da recaptação de dopamina e de outras monoaminas. Assim pesquisadores concluíram que os sintomas positivos da ESQ estão intimamente relacionados aos elevados níveis de dopamina ou de seus metabólitos em determinadas estruturas do SNC, por outro lado atribui-se os sintomas negativos da doença (ESQ) ao baixo nível de dopamina, conclusão que se chega nas observações comportamentais em animais e pacientes com lesões de córtex do lobo frontal. (ZANATTA, 2014).

1. 4. 3 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS - HIPÓTESE DO DESENVOLVIMENTO NEURAL.

Doença de neurodesenvolvimento com neurodegeneração é assim que alguns autores consideram a esquizofrenia. Com o advento das técnicas de neuroimagens pesquisadores conseguiram relatar que existe uma perda de volume cerebral nos portadores da ESQ, a restringida densidade de axônios, dendritos e sinapses são as principais suspeitas para estas alterações estruturais no SNC, ainda corroboradas com outras anormalidades encontradas

como aumento no tamanho ventricular, alterações no córtex pré-frontal e hipocampo, diminuição nos números de neurônios em algumas áreas do cérebro. (RANGEL, 2014).

1. 5 DIAGNÓSTICO

Por não existir sintomas patognomônicos, a ESQ é difícil de ser definida ou descrita, assim sendo seu diagnóstico segue as mesmas dificuldades para a definição.

1. 6 SUBTIPOS DE ESQUIZOFRENIA

Os diferentes subtipos constituem classificações baseadas na predominância de certos sintomas que têm sua utilidade principalmente para efeitos dos tratamentos medicamentosos uma vez que determinados sintomas reagem mais a certos medicamentos do que outros. (AMARAL, 2005).

Os tipos de sintomas que são utilizados para fazer um diagnóstico de esquizofrenia diferem entre as pessoas afetadas e ainda pode mudar ao longo do tratamento mesmo em uma única pessoa portadora do sofrimento que a doença progride. Os diferentes subtipos constituem classificações baseadas na predominância de certos sintomas que têm sua utilidade principalmente para efeitos dos tratamentos medicamentosos uma vez que determinados sintomas reagem mais a certos medicamentos do que outros (AMARAL, 2005).

Esses subtipos são definidos de acordo com as características clínica predominantes, assim uma mesma pessoa pode ser diagnosticada com subtipos diferentes ao longo de sua doença.

Buscando vários critérios de classificação dos tipos de ESQ, concluímos que há diversas classificações com critérios também diferenciados, optamos aqui em utilizar os critérios do DSM V, o qual utiliza apresentação clínica de sintomas para classificar a ESQ em 5 (cinco) subtipos:

1. 6. 1 ESQUIZOFRENIA PARANÓIDE

ESQ caracteriza-se pela preocupação com um ou mais delírios ou alucinações auditivas frequentes, classicamente delírios de perseguição e grandeza. Esses pacientes tendem a ser tensos, desconfiados, resguardados, reservados e podendo as vezes ser hostis e agressivos.

Este tipo de ESQ normalmente tem ocorrência ao fim da segunda ou terceira década de vida. A Esquizofrenia Paranóide é caracterizada pela presença de delírios de perseguição ou grandeza. São pacientes tensos, desconfiados, hostis e muito agressivos, podendo cometer um ato de violência.

1. 6. 2 ESQUIZOFRENIA DESORGANIZADA

Segundo Kaplan este tipo de ESQ caracteriza-se por uma regressão de comportamento exacerbado para o primitivismo e desinibição acentuada com flagrante desorganização principalmente de curso de pensamento. O portador deste tipo de ESQ costuma ser ativo, no entanto pouco produtivo. Com comprometimento da aparência pessoal e das relações sociais.

O quadro clínico tem aparecimento precoce antes dos 25 anos de idade (KAPLAN e SADOCK, 2012).

Desorganização e transtorno de pensamento, incoerência e dissociação, afetividade e respostas sócio-emocionais inadequadas, aparência pessoal e contato com a realidade precário, comportamento hilário e bizarro, maneirismo e retraimento social são os sintomas predominantes nos portadores desse subtipo de ESQ, esses pacientes podem ter suas atividades de vida diária como vestir, tomar banho ou escovar os dentes, dentre outras prejudicados ou até mesmo perderam significativamente (CARREIRA, 2008).

1. 6. 3 ESQUIZOFRENIA CATATÔNICA

Perturbação motora é seu estado clássico, como estupor, negativismo, rigidez, mutismo, excitação ou postura bizarra, costuma associar a estes sintomas flexibilidade cérea (KAPLAN e SADOCK, 2012).

Na Esquizofrenia Catatônica a característica clínica mais observada são as alterações psicomotoras, esturpor, rigidez, excitação, negativismo ou posturas bizarras, acompanhadas de estereotipias, maneirismos, mutismo e flexibilidades cérea são sintomas observados com frequência nesses pacientes.

1. 6. 4 ESQUIZOFRENIA INDIFERENCIADA

Segundo Kaplan, (2012) os pacientes são classificados neste subtipo quando não é possível enquadrá-lo em outro subtipo os pacientes têm sintomas da esquizofrenia que não são suficientemente formadas ou específicos o suficiente para permitir a classificação da doença em um dos outros subtipos.

1. 6. 5 ESQUIZOFRENIA RESIDUAL

O paciente já não apresenta sintomas proeminentes, no entanto, o tipo residual tem evidências clínicas de transtorno esquizofrênico com ausência de um conjunto completo de sintomas ativos ou sintomas insuficiente para classifica-lo em outro tipo de esquizofrenia. (KAPLAN e SADOCK, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a associação de polimorfismos nos genes *COMT*, *ZDHHC8*, na suscetibilidade à ESQ em população do Norte do Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os genótipos das variações entre as populações caso e controle, na intenção de identificar associações destes genótipos na suscetibilidade à ESQ;
- Comparar os genótipos das variações obtidas na população de pacientes com variáveis como idade, gênero, *status* de fumo e álcool, na intenção de identificar associações com essas variáveis;
- Criar um banco de DNA genômico de pacientes com ESQ do estado do Pará, para que seja utilizado no desenvolvimento de pesquisas científicas futuras, que visem esclarecer o papel das variações genômicas e suas associações com essa patologia.
- Estabelecer a linha de pesquisa Genética Psiquiátrica, no grupo de pesquisa do Laboratório de Citogenética Humana da UFPA, com consequente nucleação de seus pesquisadores, consolidação de parcerias interinstitucionais e oportunização da formação e qualificação dos discentes e técnicos envolvidos.

3 ASPECTOS ÉTICOS

Atendendo à resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, que trata das normas para pesquisa envolvendo seres humanos e armazenamento de material biológico, este projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospital de Clinicas Gaspar Viana. (anexos).

ARTIGO CIENTÍFICO

Association of *COMT* Val158Met and *ZDHHC8* rs175174 polymorphisms with schizophrenia in a population from the North Region of Brazil

Leopoldo S. Moraes ^a, Augusto C. C. Santos ^b, Hygor Ferreira-Fernandes ^b, France K. N. Yoshioka ^b, Silmar S. Teixeira ^c, Adriana C. Guimarães ^a, Carlos A. M. da Rocha ^d, Juan A. Rey ^e, Giovanni R. Pinto ^{b*}, Rommel R. Burbano ^a

^a Human Cytogenetics Laboratory, Department of Biology, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil

^b Genetics and Molecular Biology Laboratory, Federal University of Piauí, Parnaíba, PI, Brazil

^c Cerebral Mapping and Plasticity Laboratory, Federal University of Piauí, Parnaíba, PI, Brazil

^d Education Federal Institute, Science and Technology of Pará, Belém, PA, Brazil

^e Molecular Oncogenetics Laboratory, Department of Experimental Surgery, University Hospital of La Paz, Madrid, Spain

***Corresponding author:** Giovanni R. Pinto

Genetics and Molecular Biology Laboratory, Federal University of Piauí Av.
São Sebastião 2819, 64202-020, Parnaíba, PI, Brazil

Tel.: 55-86-3323-5846

Fax: 55-91-32017601

E-mail: pintogr@ufpi.edu.br

Abstract: The *COMT* Val158Met and *ZDHHC8* rs175174 polymorphisms have received increased attention in the molecular study of schizophrenia not only because they are localised to the main susceptibility locus of the disease, 22q11, but also because they are related to the dopaminergic status of the prefrontal cortex and the activity of several neuronal proteins, respectively. To evaluate the influence of the polymorphic genotypes on schizophrenia, we used real-time PCR to genotype 130 patients and 175 controls in a

population from the North Region of Brazil. Our results indicated an absence of association between both polymorphisms and the likelihood of schizophrenia in the population studied. However, when categorised by gender, we

found a dichotomous association between the Met/Met genotype of the *COMT* Val158Met polymorphism and susceptibility to schizophrenia, conferring a higher probability of disease in men (OR = 10.76; CI 95% = 2.09–55.34; $p = 0.004$) than in women (OR = 0.23; CI 95% = 0.07–0.69; $p = 0.009$). Moreover, the variance analysis showed an association of the genotypes Val/Met (*COMT* Val158Met) and GG (*ZDHHC8* rs175174) with higher average age at onset of schizophrenia. Our study supports the hypothesis of a gender-dependent association of the *COMT* Val158Met polymorphism with schizophrenia, in addition to suggesting an influence of both polymorphisms studied on the age at disease onset.

Keywords: Schizophrenia; *COMT*; *ZDHHC8*; Polymorphisms; Age at onset; Gender.

1. Introduction

Schizophrenia is a psychiatric disease of high heritability (approximately 80%), which suggests that genetic factors play a fundamental role in its etiopathogenesis (Singh et al., 2014). Epidemiological evidence indicates a close relationship between schizophrenia and a genetic syndrome caused by 22q11 microdeletions, known as velocardiofacial syndrome. Approximately 20% to 25% of the carriers of this syndrome develop schizophrenia, and 22q11 microdeletions have been reported in 1% to 2% of patients diagnosed with schizophrenia (Horowitz et al., 2005; Xu et al., 2008; Monks et al., 2014). This chromosomal fragment has thus been the target of genetic association studies in different populations worldwide in search for causal genes and, in particular, functional genetic variants capable of predicting the individual susceptibility to schizophrenia.

Among the genes located on 22q11, special attention has been given to the catechol-O-methyl transferase (*COMT*) gene, which codes for a homonymous enzyme responsible for the degradation of several biomolecules, including dopamine in the prefrontal cortex. Dopamine is considered a key neurotransmitter in the pathophysiology of schizophrenia, particularly because many antipsychotic agents act on dopaminergic receptors (Williams et al., 2012). A polymorphism characterised by a valine (Val) to methionine (Met) substitution in codon 158 of the *COMT* gene (Val158Met; rs4680) alters the functional dynamics of the COMT enzyme, with the Val/Val genotype showing a higher activity, the Val/Met genotype showing an intermediate activity, and the Met/Met genotype showing a reduced activity (Lotta et al., 1995; Williams et al., 2012). The hypo and hyperdopaminergic states in the prefrontal cortex, caused by the high and reduced activity of the COMT enzyme, respectively, have been considered important events in the genesis of schizophrenia (Kotler et al., 1999; Shifman et al., 2002; Costas et al., 2011).

The zinc finger DHHC domain-containing protein 8 (*ZDHHC8*) gene is another potential genetic susceptibility factor for schizophrenia, not only because it is localised in the microdeletion 22q11 region but also because it is closely related to neuronal development and function (Ota et al., 2013). The palmitoyltransferase-like enzyme coded by the *ZDHHC8* gene promotes post-translational changes in several cytosolic neuron membrane proteins, ensuring their adequate trafficking and functioning. The rs175174 (A/G) polymorphism located in intron 4 of the *ZDHHC8* gene hinders the

correct splicing of its primary transcript, favouring the retention of intron 4 in the final transcript, which in turn is translated into a truncated form of the protein (Mukai et al., 2004).

Although several genetic association studies have obtained results suggesting a significant association of the *COMT* Val158Met and *ZDHHC8* rs175174 polymorphisms with schizophrenia in terms of susceptibility, age at onset, or other clinical features (Chen et al., 2004; Mukai et al., 2004; Sazci et al., 2004; Hoenicka et al., 2010; Costas et al., 2011), the role of these polymorphisms as markers of susceptibility for the disease is still controversial. In the present study, we evaluated the association between the *COMT* Val158Met and *ZDHHC8* rs175174 polymorphisms and the susceptibility to schizophrenia through a case-control study involving a population from the North Region of Brazil.

2. Materials and Methods

2.1. Study participants

In total, 130 unrelated patients with schizophrenia (70 men and 60 women; mean age of 42.97 ± 13.13 years) and 175 healthy individuals (87 men and 88 women; mean age of 40.06 ± 13.66 years) were included in the present study for the case-control analysis. The patients were recruited at the Clinical Hospital Gaspar Viana in the city of Belém, state of Pará, Brazil, and the individuals in the control group were recruited from the general population in Belém; the majority were employees at the hospital and college students, without any kinship between them or with the patients included in the study.

The diagnosis of schizophrenia was independently confirmed by two experienced psychiatrists using the Structured Clinical Interview for DSM-IV Disorders (SCID). The non-patient edition of the SCID was applied to the control individuals, and those with a personal or family history of psychotic disease were excluded from the study. After receiving an explanation of the research objectives and procedures, the patients or their legal representatives and the individuals in the control group signed an informed consent form authorising the collection of blood for the genetic analyses. Patient clinical data and information such as gender, age, smoking status and alcohol consumption status were obtained for both groups from the medical records and the

structured questionnaires. Age at onset was defined as the age at which the patient was diagnosed with the disease, whereas refractory disease was defined according to the International Psychopharmacological Criteria. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Clinical Hospital Gaspar Viana.

2.2. Genotyping

The genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes using the conventional phenol-chloroform extraction method. Genotyping of *COMT* Val158Met and *ZDHHC8* rs175174 polymorphisms was performed through allelic discrimination with real-time PCR using TaqMan probes (TaqMan[®] SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems). For the purposes of quality control, 10% of the samples were randomly selected and re-genotyped, and all replicated the genotype that was initially attributed.

2.3. Statistical analysis

First, both polymorphisms were tested for Hardy-Weinberg equilibrium using the Chi-square test (χ^2). Linkage disequilibrium was analysed using the D' and r^2 parameters, assisted by the HaploView 4.2 software (MIT/Harvard Broad Institute, Cambridge, MA, USA). To evaluate the association between the polymorphisms investigated and susceptibility to schizophrenia, odds ratios (ORs) with confidence intervals of 95% (CI 95%) were calculated by logistic regression (crude ORs), assuming three alternative transmission models (dominant, recessive, and overdominant). Adjusted ORs were obtained by controlling for the variables of age, gender, smoking status, and alcohol consumption status. One-way ANOVA was used to compare the differences in genotype and allele distribution with regard to age at onset of disease in the patient group. A probability level of 5% was considered to indicate statistical significance. SPSS software version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for the statistical analyses.

3. Results

The genotype frequencies of the *COMT* Val158Met ($p = 0.216$ for the case group and $p = 0.544$ for the control group) and *ZDHHC8* rs175174 ($p = 0.460$ for the case group and $p = 0.274$ for the control group) polymorphisms did not differ

significantly from the expected frequencies predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium. Moreover, the haplotype analysis revealed a weak linkage disequilibrium ($D' = 0.042$, $r^2 = 0.001$) between the polymorphisms; therefore, the haplotypes were not used in the subsequent analyses. Table 1 presents the clinical and sociodemographic characteristics of the patients and controls who participated in the study.

The association between polymorphic genotypes and alleles and schizophrenia revealed that, for the *COMT* Val158Met polymorphism, there was no association with the occurrence of schizophrenia among patients and controls (Table 2). However, when categorised by gender, the recessive model among men presented a significant difference (crude OR = 7.92; CI 95% = 1.70–37.06; $p = 0.006$), which was sustained when the model was adjusted for age, smoking status, and alcohol consumption status (OR = 10.76; CI 95% = 2.09–55.34; $p = 0.004$). Among women, the crude OR did not show statistically significant differences for any of the genotypic models, but the adjusted OR revealed that the recessive model seemed to be associated with a reduced likelihood of schizophrenia (OR = 0.23; CI 95% = 0.07–0.69; $p = 0.009$). For the *ZDHHC8* rs175174 polymorphism, neither the crude nor adjusted ORs showed statistically significant differences in any of the models adopted (Table 3).

In patients with schizophrenia, ANOVA revealed that the average ages at disease onset were significantly different according to the three genotypes for both the *COMT* Val158Met ($F_{2, 128} = 4.684$; $p = 0.011$) and *ZDHHC8* rs175174 ($F_{2, 128} = 3.857$; $p = 0.024$) polymorphisms (Table 4). A post-hoc Bonferroni test showed that, for the *COMT* Val158Met polymorphism, the Val/Met genotype showed a significant increase in the average age at onset compared to the Val/Val ($p = 0.040$) and Met/Met ($p = 0.035$) genotypes, whereas the alleles individually were not associated with age at onset. For the *ZDHHC8* rs175174 polymorphism, the GG genotype also showed a significant increase in the average age at onset compared to the AA ($p = 0.033$) and AG ($p = 0.030$) genotypes, and the allelic comparison indicated a statistical association ($p = 0.006$) between the absence of allele A and a greater average age at disease onset.

4. Discussion

The 22q11 chromosomal region has received increased attention in the molecular study of schizophrenia because carriers of velocardiofacial syndrome, which is caused by microdeletions in that region, have a higher predisposition for developing the disease (Karayiorgou and Gogos, 2004; Owen et al., 2004). Therefore, functional

polymorphisms of genes localised in this chromosomal fragment have been investigated as probable markers of a genetic predisposition to schizophrenia. *COMT* and *ZDHHC8* are among the main candidate genes for genetic association studies, not only because they are localised to 22q11 but also because they perform critical roles in the functioning of brain activities. In the present study, the *COMT* Val158Met and *ZDHHC8* rs175175 polymorphisms were not associated with the occurrence of schizophrenia in a population from the North Region of Brazil, which is consistent with the results from studies in other populations (Faul et al., 2005; Galderisi et al., 2005; Glaser et al., 2006).

Nonetheless, according to our results, men harbouring the Met/Met genotype of the *COMT* Val158Met polymorphism may be eight to 10 times more likely to develop schizophrenia. Interestingly, the same genotype was found to be protective against the development of the disease in women. In contrast, our results support the classic hyperdopaminergic hypothesis related to the aetiology of schizophrenia. Met/Met homozygous individuals present low levels of COMT enzyme activity and, consequentially, an increase in the levels of dopamine in the prefrontal cortex (Lotta et al., 1995; Bhakta et al., 2012). The hyperdopaminergic state associated with low COMT activity has been noted as one of the aetiological conditions of schizophrenia (Kotler et al., 1999; Costas et al., 2011; Williams et al., 2012).

To our knowledge, the association between the presence of the Met allele and susceptibility to schizophrenia was reproduced only in three other studies. Ohmori et al. (1998) suggested that the Met allele was more common in a group of patients with schizophrenia in a Japanese population than in the controls due to an increase in heterozygosity but not in homozygosity. In a Korean population, Park et al. (2002) reported that individuals harbouring at least one copy of the Met allele showed a high probability of occurrence of schizophrenia compared to homozygous Val/Val individuals. In contrast, Saczi et al. (2004) showed, in a population sample from Turkey, that Met/Met women presented a 2.5 times higher probability of developing schizophrenia, whereas men presented a probability only 1.8 times higher.

It is important to highlight that, according to two large meta-analyses, the majority of studies of the *COMT* Val158Met polymorphism, in addition to showing an absence of association with schizophrenia, take into consideration the Val allele as a risk allele because the reduction in the levels of dopamine in the prefrontal cortex (hypodopaminergic hypothesis) is also considered an important event in the genesis of schizophrenia (Fan et al., 2005; Okoshi et al., 2009).

In addition to susceptibility, the Met/Met genotype of the *COMT* Val158Met polymorphism has also exhibited a modulating role in schizophrenia that differs between genders. For example, Kotler et al. (1999) showed a statistically significant association between the Met/Met genotype and homicidal behaviour predominantly in men with schizophrenia ($p = 0.005$). Similarly, Bhakta et al. (2012) reported in a recent meta-analysis that, in considering a recessive model, patients with schizophrenia who are Met/Met homozygous showed a higher likelihood of violence than carriers of the Val allele (OR = 1.74; CI 95% = 1.10–2.73; $p = 0.017$), suggesting a predominant violent behaviour among men with the Met allele.

Interestingly, our study reveals a noteworthy dichotomy between the effects of the Met/Met genotype of the *COMT* Val158Met polymorphism and the occurrence of schizophrenia in the population studied in that this genotype is strongly associated with the likelihood of schizophrenia in men, and an opposite effect is observed in women. Such phenotypical differences between genders may reflect the mild contribution of *COMT* variants in women, likely due to the negative oestrogen-mediated regulation of *COMT*, which protects women from the effects of these variants. However, other factors responsible for *COMT* regulation in the brain, such as epigenetic mechanisms of control or interactions between components of other biochemical pathways, may also be involved (Harrison and Tunbridge, 2007; Hoenicka et al., 2010).

In our population, susceptibility to schizophrenia was not associated with the *ZDHHC8* rs175174 polymorphism, in contrast to the hypothesis suggested by Chen et al. (2004) in a case-control study in the Han Chinese population. Moreover, the association remained statistically negative when the population was categorised by gender, as suggested by Faul et al. (2005). In this manner, our findings are consistent with those of other studies reporting the absence of an association between this polymorphism and schizophrenia in European and Asian populations, as noted in a recent meta-analysis (Sun et al., 2015).

The risk of schizophrenia increases markedly from pre-adolescence and reaches its peak at the beginning of adult age. Beyond that peak, the disease incidence decreases gradually, and after 60 years of age, the incidence rates remain stable (van der Werf et al., 2012). In the present study, the age of patients with schizophrenia at the time of diagnosis ranged from 14 to 48 years, with an average of 25.28 ± 7.28 years. It is estimated that 33% of the variation related to the age at onset of the psychotic symptoms of schizophrenia is influenced by genetic factors (Hare et al., 2010). In fact, several polymorphisms of schizophrenia-related genes have been associated with the

development of the disease at earlier or later stages in life (Bergen et al., 2014). In addition to the prognostic value, the validation of such polymorphisms suggests the possibility of preventive strategies directed to the relatives of patients with schizophrenia at vulnerable ages (Hare et al., 2010).

In the present study, the age at onset of schizophrenia varied significantly between the genotypes of the *COMT* Val158Met polymorphism. As reported by Tsai et al. (2004) in Chinese patients, our results show an association of the Val/Met genotype with a higher age at onset of schizophrenia than with the Val/Val or Met/Met genotypes ($p = 0.040$ and $p = 0.035$, respectively). Many other studies support the significant influence of the *COMT* Val158Met polymorphism on the age at onset of schizophrenia, but the associations between the genotypes and the early or later onset of the disease are contradictory (Galderisi et al., 2005; Abdolmaleky et al., 2006; Pelayo-Teram et al., 2007; Tsuchimine, et al., 2013).

In contrast, the few studies that have investigated the involvement of the *ZDHHC8* rs175174 polymorphism in the age at onset of schizophrenia did not observe significant variation in the age at onset between the different genotypes of this polymorphism (Faul et al., 2005, Xu et al., 2010). The present study is the first to show evidence of this association. Individuals harbouring the GG genotype showed a significant tendency of being diagnosed with schizophrenia at a more advanced age than individuals harbouring the genotypes AA ($p = 0.033$) or GA ($p = 0.030$).

We do not exclude the possibility of an influence of the reduced sample number on the associations observed in the present study. For example, Tsai et al. (2004), after increasing the number of samples analysed, could not reproduce the initial association between the Val/Met genotype of the *COMT* Val158Met polymorphism and the increase in the age at onset of schizophrenia. Moreover, environmental factors such as alcohol consumption and the use of illegal drugs may also alter the age at onset of the first manifestation of schizophrenia, and these factors may have influenced our results (Donoghue et al., 2014, Nowrouzi et al., 2015). Another potential factor that may contribute to the observation of controversial results is the heterogeneous nature of the Brazilian population, including the Northern population studied here; the population reflects more than five centuries of inter-ethnic crossings between people from three continents: the European colonisers (mainly Portuguese), the African slaves, and the native Amerindian (Parra et al., 2003).

In conclusion, this study presents evidence of an association between the *COMT* Val158Met polymorphism and schizophrenia in a population from the North Region of

Brazil. However, our results suggest that the effect of this polymorphism on the susceptibility to schizophrenia is modulated by gender. In addition, the age at onset of schizophrenia seems to be influenced by the genotypes of the *COMT* Val158Met and *ZDHHC8* rs175174 polymorphisms. Our findings should be interpreted with caution due to the reduced sample size, and thus, the replication of these results, in studies with a large number of participants of different ethnic origins, is necessary for their validation and generalisation.

I. References

- Abdolmaleky, H.M., Cheng, K.H., Faraone, S.V., Wilcox, M., Glatt, S.J., Gao, F., Smith, C.L., Shafa, R., Aeali, B., Carnevale, J., Pan, H., Papageorgis, P., Ponte, J.F., Sivaraman, V., Tsuang, M.T., Thiagalingam, S., 2006. Hypomethylation of MB- COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum. Mol. Genet.* 15, 3132–3145.
- Bergen, S.E., O'Dushlaine, C.T., Lee, P.H., Fanous, A.H., Ruderfer, D.M., Ripke, S., Sullivan, P.F., Smoller, J.W., Purcell, S.M., Corvin, A., 2014. Genetic modifiers and subtypes in schizophrenia: investigations of age at onset, severity, sex and family history. *Schizophr. Res.* 154, 48–53.
- Bhakta, S.G., Zhang, J.P., Malhotra, A.K., 2012. The COMT Met158 allele and violence in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr. Res.* 140, 192–197.
- Chen, W.Y., Shi, Y.Y., Zheng, Y.L., Zhao, X.Z., Zhang, G.J., Chen, S.Q., Yang, P.D., He, L., 2004. Case-control study and transmission disequilibrium test provide consistent evidence for association between schizophrenia and genetic variation in the 22q11 gene ZDHHC8. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2991–2995.
- Costas, J., Sanjuán, J., Ramos-Ríos, R., Paz, E., Agra, S., Ivorra, J.L., Páramo, M., Brenlla, J., Arrojo, M., 2011. Heterozygosity at catechol-O-methyltransferase Val158Met and schizophrenia: new data and meta-analysis. *J. Psychiatr. Res.* 45, 7– 14.
- Donoghue, K., Doody, G.A., Murray, R.M., Jones, P.B., Morgan, C., Dazzan, P., Hart, J., Mazzoncini, R., Maccabe, J.H., 2014. Cannabis use, gender and age of onset of schizophrenia: data from the ÆSOP study. *Psychiatry Res.* 215, 528–532.
- Fan, J.B., Zhang, C.S., Gu, N.F., Li, X.W., Sun, W.W., Wang, H.Y., Feng, G.Y., St Clair, D., He, L., 2005. Catechol-O-methyltransferase gene Val/Met functional polymorphism and risk of schizophrenia: a large-scale association study plus meta-analysis. *Biol. Psychiatry.* 57, 139–144.
- Faul, T., Gawlik, M., Bauer, M., Jung, S., Pfuhlmann, B., Jabs, B., Knapp, M., Stöber, G., 2005. ZDHHC8 as a candidate gene for schizophrenia: analysis of a putative functional intronic marker in case-control and family-based association studies. *BMC Psychiatry.* 5, 1–4.
- Galderisi, S., Maj, M., Kirkpatrick, B., Piccardi, P., Mucci, A., Invernizzi, G., Rossi, A., Pini, S., Vita, A., Cassano, P., Stratta, P., Severino, G., Del Zompo, M., 2005.

- COMT Val(158)Met and BDNF C(270)T polymorphisms in schizophrenia: a case-control study. *Schizophr. Res.* 73, 27–30.
- Glaser, B., Moskvina, V., Kirov, G., Murphy, K.C., Williams, H., Williams, N., Owen, M.J., O'Donovan, M.C., 2006. Analysis of ProDH, COMT and ZDHHC8 risk variants does not support individual or interactive effects on schizophrenia susceptibility. *Schizophr. Res.* 87, 21–27.
- Hare, E., Glahn, D.C., Dassori, A., Raventos, H., Nicolini, H., Ontiveros, A., Medina, R., Mendoza, R., Jerez, A., Muñoz, R., Almasy, L., Escamilla, M.A., 2010. Heritability of age of onset of psychosis in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr. Genet.* 153B, 298–302.
- Harrison, P.J., Tunbridge, E.M., 2008. Catechol-O-methyltransferase (COMT): a gene contributing to sex differences in brain function, and to sexual dimorphism in the predisposition to psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology.* 33, 3037–3045.
- Hoienicka, J., Garrido, E., Martínez, I., Ponce, G., Aragüés, M., Rodríguez-Jiménez, R., España-Serrano, L., Alvira-Botero, X., Santos, J.L., Rubio, G., Jiménez-Arriero, M.A., Palomo, T., 2010. Gender-specific COMT Val158Met polymorphism association in Spanish schizophrenic patients. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 153B, 79–85.
- Horowitz, A., Shifman, S., Rivlin, N., Pisanté, A., Darvasi, A., 2005. A survey of the 22q11 microdeletion in a large cohort of schizophrenia patients. *Schizophr. Res.* 73, 263–267.
- Karayiorgou, M., Gogos, J.A., 2004. The molecular genetics of the 22q11-associated schizophrenia. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 132, 95–104.
- Kotler, M., Barak, P., Cohen, H., Averbuch, I.E., Grinshpoon, A., Gritsenko, I., Nemanov, L., Ebstein, R.P., 1999. Homicidal behavior in schizophrenia associated with a genetic polymorphism determining low catechol O-methyltransferase (COMT) activity. *Am. J. Med. Genet.* 88, 628–633.
- Lotta, T., Vidgren, J., Tilgmann, C., Ulmanen, I., Melén, K., Julkunen, I., Taskinen, J., 1995. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry.* 34, 4202–4210.
- Monks, S., Niarchou, M., Davies, A.R., Walters, J.T., Williams, N., Owen, M.J., van den Bree, M.B., Murphy, K.C., 2014. Further evidence for high rates of schizophrenia in 22q11.2 deletion syndrome. *Schizophr. Res.* 153, 231–236.

- Mukai, J., Liu H., Burt, R.A., Swor, D.E., Lai, W.S., Karayiorgou, M., Gogos, J.A., 2004. Evidence that the gene encoding ZDHHC8 contributes to the risk of schizophrenia. *Nat. Genet.* 36, 725–731.
- Nowrouzi, B., Kamhi, R., Hu, J., Kennedy, J.L., Matmari, M., De Luca, V., 2015. Age at onset mixture analysis and systematic comparison in schizophrenia spectrum disorders: Is the onset heterogeneity dependent on heterogeneous diagnosis? *Schizophr. Res.* 164, 83–91.
- Ohmori, O., Shinkai, T., Kojima, H., Terao, T., Suzuki, T., Mita, T., Abe, K., 1998. Association study of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in Japanese schizophrenics. *Neurosci. Lett.* 243, 109–112.
- Okochi, T., Ikeda, M., Kishi, T., Kawashima, K., Kinoshita, Y., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Tomita, M., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., 2009. Meta-analysis of association between genetic variants in COMT and schizophrenia: an update. *Schizophr. Res.* 110, 140–148.
- Ota, V.K., Gadelha, A., Assunção, I.B., Santoro, M.L., Christofolini, D.M., Bellucco, F.T., Santos-Filho, A.F., Ottoni, G.L., Lara, D.R., Mari, J.J., Melaragno, M.I., Smith, M.A., Bressan, R.A., Belangero, S.I., Jackowski, A.P., 2013. ZDHHC8 gene may play a role in cortical volumes of patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 145, 33–35.
- Owen, M.J., Williams, N.M., O'Donovan, M.C., 2004. The molecular genetics of schizophrenia: new findings promise new insights. *Mol. Psychiatry.* 9, 14–27.
- Park, T.W., Yoon, K.S., Kim, J.H., Park, W.Y., Hirvonen, A., Kang, D., 2002. Functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and susceptibility to schizophrenia. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 12, 299–303.
- Parra, F.C., Amado, R.C., Lambertucci, J.R., Rocha, J., Antunes, C.M., Pena, S.D., 2003. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 177–182.
- Pelayo-Terán, J.M., Crespo-Facorro, B., Carrasco-Marín, E., Pérez-Iglesias, R., Mata I., Arranz, M.J., Leyva-Cobián, F., Vázquez-Barquero, J.L., 2008. Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and clinical characteristics in first episode non-affective psychosis. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 147B, 550–556.
- Sazci, A., Ergul, E., Kucukali, I., Kilic, G., Kaya, G., Kara, I., 2004. Catechol-O-methyltransferase gene Val108/158Met polymorphism, and susceptibility to

- schizophrenia: association is more significant in women. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 132, 51–56.
- Shifman, S., Bronstein, M., Sternfeld, M., Pisanté-Shalom, A., Lev-Lehman, E., Weizman, A., Reznik, I., Spivak, B., Grisaru, N., Karp, L., Schiffer, R., Kotler, M., Strous, R.D., Swartz-Vanetik, M., Knobler, H.Y., Shinar, E., Beckmann, J.S., Yakir B., Risch, N., Zak, N.B., Darvasi, A., 2002. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 1296–1302.
- Singh, S., Kumar, A., Agarwal, S., Phadke, S.R., Jaiswal, Y., 2014. Genetic insight of schizophrenia: past and future perspectives. *Gene.* 535, 97–100.
- Tsai, S.J., Hong, C.J., Liao, D.L., Lai, I.C., Liou, Y.J., 2004. Association study of a functional catechol-O-methyltransferase genetic polymorphism with age of onset, cognitive function, symptomatology and prognosis in chronic schizophrenia. *Neuropsychobiology.* 49, 196–200.
- Tsuchimine, S., Yasui-Furukori, N., Kaneda, A., Kaneko S., 2013. Differential effects of the catechol-O-methyltransferase Val158Met genotype on the cognitive function of schizophrenia patients and healthy Japanese individuals. *PLoS One.* 8, e76763.
- Van der Werf, M., Hanssen, M., Köhler, S., Verkaaik, M., Verhey, F.R., van Winkel, R., van Os, J., Allardyce, J., 2014. Systematic review and collaborative recalculation of 133,693 incident cases of schizophrenia. *Psychol. Med.* 44, 9–16.
- Williams, H.J., Owen, M.J., O'Donovan, M.C., 2007. Is COMT a susceptibility gene for schizophrenia? *Schizophr. Bull.* 33, 635–641.
- Xu, B., Roos, J.L., Levy, S., van Rensburg, E.J., Gogos, J.A., Karayiorgou, M., 2008. Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nat. Genet.* 40, 880–885.
- Xu, M., St Clair, D., He, L., 2010. Testing for genetic association between the ZDHHC8 gene locus and susceptibility to schizophrenia: An integrated analysis of multiple datasets. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 153B, 1266–75.

Tabela1

Características clínicas e sociodemográficas dos participantes do estudo.

Variável	Pacientes (n = 130)	Controles (n = 175)
Idade (anos)	42,97 ± 13,13	40,06 ± 13,66
Gênero		
Masculino	53,85%	49,71%
Feminino	46,15%	50,29%
Status de fumo		
Positivo	13,85%	22,29%
Negativo	86,15%	77,71%
Status de álcool		
Positivo	34,61%	17,14%
Negativo	65,38%	82,86%
Histórico familiar		
Positivo	20,77%	0,0%
Negativo	79,23%	100%
Idade de início		
Total	25,28 ± 7,28	NA
Homens	23,64 ± 7,64	NA
Mulheres	27,20 ± 6,38	NA
Doença refratária		
Positivo	21,54%	NA
Negativo	78,46%	NA
Subtipo		
Paranoide	42,31%	NA
Desorganizado	16,92%	NA
Catatônico	13,08%	NA
Residual	16,92%	NA
Indiferenciado	10,77%	NA

NA, não aplicável.

Tabela 2Distribuição dos genótipos do polimorfismo *COMT* Val158Met entre pacientes e controles.

<i>COMT</i> Val158Met	Pacientes n (%)	Controles n (%)	OR dominante (IC 95%; p)	OR recessivo (IC 95%; p)	OR <i>overdominant</i> (IC 95%; p)
Total	130 (100)	175 (100)			
Val/Val	62 (47,7)	80 (45,7)	0,92 (0,59–1,46; 0,821)	1,10 (0,56–2,19; 0,915)	0,88 (0,55–1,40; 0,675)
Val/Met	51 (39,2)	74 (42,3)	0,85 (0,52–1,38; 0,518) ^a	1,12 (0,53–2,34; 0,767) ^a	0,81 (0,50–1,32; 0,399) ^a
Met/Met	17 (13,1)	21 (12)			
Homens	70 (100)	87 (100)			
Val/Val	35 (50,0)	46 (52,9)	1,12 (0,60–2,10; 0,843)	7,92 (1,70–37,06; 0,006)	0,64 (0,34–1,23; 0,240)
Val/Met	24 (34,3)	39 (44,8)	1,20 (0,62–2,33; 0,589) ^b	10,76 (2,09–55,34; 0,004) ^b	0,63 (0,31–1,24; 0,182) ^b
Met/Met	11 (15,7)	2 (2,3)			
Mulheres	60 (100)	88 (100)			
Val/Val	27 (45,0)	34 (38,6)	0,77 (0,40–1,50; 0,547)	0,40 (0,15–1,10; 0,104)	1,24 (0,64–2,41; 0,643)
Val/Met	27 (45,0)	35 (39,8)	0,50 (0,94–4,32; 0,073) ^b	0,23 (0,07–0,69; 0,009) ^b	1,10 (0,54–2,27; 0,786) ^b
Met/Met	6 (10,0)	19 (21,6)			

OR, *odds ratio*; IC, Intervalo de confiança; modelo dominante (heterozigoto + homozigoto mutante versus homozigoto selvagem); modelo recessivo (homozigoto mutante vs. heterozigoto + homozigoto selvagem); modelo *overdominant* (heterozigoto vs. homozigoto mutante + homozigoto selvagem).

^aOR ajustado por sexo, idade, *status* de fumo e álcool.

^bOR ajustado por idade, *status* de fumo e álcool.

Tabela 3Distribuição dos genótipos do polimorfismo *ZDHHC8* 175174 em pacientes e controles.

<i>ZDHHC8</i> 175174	Pacientes n (%)	Controles n (%)	OR dominante (IC 95%; p)	OR recessivo (IC 95%; p)	OR <i>overdominant</i> (IC 95%; p)
Total	130 (100)	175 (100)			
AA	46 (35,4)	69 (39,4)	1,19 (0,74–1,90; 0,548)	1,32 (0,66–2,63; 0,540)	1,04 (0,66–1,64; 0,947)
AG	66 (50,8)	87 (49,7)	1,15 (0,70–1,90; 0,582) ^a	1,48 (0,72–3,05; 0,291) ^a	0,96 (0,59–1,56; 0,869) ^a
GG	18 (13,8)	19 (10,9)			
Homens	70 (100)	87 (100)			
AA	24 (34,3)	37 (42,5)	1,42 (0,74–2,72; 0,374)	0,52 (0,15–1,78; 0,450)	1,68 (0,89–3,18; 0,148)
AG	42 (60,0)	41 (47,1)	1,27 (0,64–2,52; 0,489) ^b	0,53 (0,15–1,90; 0,326) ^b	1,51 (0,78–2,95; 0,223) ^b
GG	4 (5,7)	9 (10,4)			
Mulheres	60 (100)	88 (100)			
AA	22 (36,7)	32 (36,4)	0,99 (0,50–1,95; 0,892)	2,37 (0,97–5,78; 0,087)	0,61 (0,31–1,18; 0,193)
AG	24 (40,0)	46 (52,3)	1,21 (0,56–2,60; 0,625) ^b	2,44 (0,96–6,24; 0,062) ^b	0,67 (0,31–1,42; 0,298) ^b
GG	14 (23,3)	10 (11,3)			

OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança; modelo dominante (heterozigoto + homozigoto mutante vs. homozigoto selvagem); modelo recessivo (homozigoto mutante vs. heterozigoto + homozigoto selvagem); modelo *overdominant* (heterozigoto vs. homozigoto mutante + homozigoto selvagem).

^aOR ajustado por sexo, idade, *status* de fumo e álcool.

^bOR ajustado por idade, *status* de fumo e álcool.

Tabela 4

Médias da idade de início e resultados do teste ANOVA para frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos *COMT* Val158Met e *ZDHHC8* rs175174 entre pacientes com esquizofrenia.

Genótipos		Idade de início (anos)	F	p	Teste de Bonferroni (p)			Alelos	Idade de início (anos)	t	p	
		Média ± DP			Homozigoto selvagem vs. heterozigoto	Homozigoto selvagem vs. homozigoto mutante	Heterozigoto vs. homozigoto mutante		Média ± DP			
COMT Val158Met	Val/Val	24,19 ± 6,85	4,684	0,011	0,040	1,000	0,035	Val	Presente	25,71 ± 7,37	1,722	0,087
	Val/Met	27,55 ± 7,63							Ausente	22,47 ± 6,10		
	Met/Met	22,47 ± 6,10						Met	Presente	26,28 ± 7,57	1,642	0,103
		Ausente							24,19 ± 6,85			
ZDHHC8 rs175174	AA	24,50 ± 7,28	3,857	0,024	1,000	0,033	0,030	A	Presente	24,59 ± 7,37	2,786	0,006
	AG	21,65 ± 7,48							Ausente	29,61 ± 5,00		
	GG	29,61 ± 5,00						G	Presente	25,71 ± 7,29	0,909	0,365
									Ausente	24,50 ± 7,28		

DP, desvio padrão.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFENJAR, A.; Moutard, M. L.; Doummar, D., et al. Early neurological phenotype in 4 children with biallelic PRODH mutations. *Brain Dev*, 29(9): 547-52. 2007. American Psychiatric Association, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV). 4th ed., American Psychiatric Association, Washington, DC, 1994.
- ANDREASEN, N. C. Symptoms, Signs, and Diagnosis of Schizophrenia. *Lancet*, 346(8973): 477-481, 1995.
- BATISTA dos Santos, S.E.; Rodrigues, J.D.; Ribeiro-dos-Santos, A. K., et al. Differential contribution of indigenous men and women to the formation of an urban population in the Amazon region as revealed by mtDNA and Y-DNA. *Am J Phys Anthropol*, 109: 175-180, 1999.
- BENDER, H. U.; Almashanu, S.; Steel, G., et al. Functional consequences of PRODH missense mutations. *Am J Hum Genet*, 76(3): 409-20. 2005.
- BOGERTS, B. - The neuropathology of schizophrenia diseases: historical aspects and present knowledge. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249(4): 2-13, 1999.
- BORELLA, V. C. M. Modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia induzida pela administração neonatal de cetamina em ratos: avaliação da influência do sexo e efeito antipsicótico. Dissertação de Mestrado. (2013).
- CARREIRA. G. O. Esquizofrenia: Uma abordagem geral, com enfoque na assistência de enfermagem e familiar. 2008.
- CHENG MC, Chuang YA, Lu CL, Chen YJ, Luu SU, Li JM, Hsu SH, Chen CH. Genetic and functional analyses of early growth response (EGR) family genes in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. Oct 1;39(1):149-55. 2012.
- CLELLAND CL, Read LL, Baraldi AN, Bart CP, Pappas CA, Panek LJ, Nadrich RH, Clelland JD. Evidence for association of hyperprolinemia with schizophrenia and a measure of clinical outcome. *Schizophr Res*. Sep;131(1-3):139-45. 2011.
- DE LUCA, A.; Pasini, A.; Amati, F., et al. Association study of a promoter polymorphism of UFD1L gene with schizophrenia. *Am J Med Genet*, 105(6): 529-33. 2001.
- EL-HUSSEINI Ael, D.; Bredt, D. S. Protein palmitoylation: a regulator of neuronal development and function. *Nat Rev Neurosci*, 3(10): 791-802. 2002.
- FORCHESALTO, A.J.; BOFF, E.T. O Recovery (REESTABELECIMENTO). No processo de Alfabetização de Jovens e Adultos com Doenças Mentais no CAPS Colméia e Ijuí: Relato de Uma Experiência. *Ciência-Tecnologia-desenvolvimento social unijui* 2014. Disponível em: File:///C:/Users/NOTEBOOK/downloads/3476/14575-1-PB.pdf> Acesso em: 10 out 2014.

GIUSTI-RODRÍGUEZ P, Sullivan PF. The genomics of schizophrenia: update and implications. *J Clin Invest*. Nov 1;123(11):4557-63. 2013.

GOTHELF D, Law AJ, Frisch A, Chen J, Zarchi O, Michaelovsky E, Ren-Patterson R, Lipska BK, Carmel M, Kolachana B, Weizman A, Weinberger DR. Biological Effects of COMT Haplotypes and Psychosis Risk in 22q11.2 Deletion Syndrome. *Biol Psychiatry*. Aug 27. pii: S0006-3223(13)00675-6. 2013.

GRAF, W. D.; Unis, A. S.; Yates, C. M., et al. Catecholamines in patients with 22q11.2 deletion syndrome and the low-activity COMT polymorphism. *Neurology*, 57(3):410-6. 2001.

HANSEN, N. F. et all. A sobrecarga de cuidadores de pacientes com esquizofrenia: uma revisão integrativa da literatura. *Rev. Eletr. Enf*. 2014.

IRA E, Zanoni M, Ruggeri M, Dazzan P, Tosato S. COMT, neuropsychological function and brain structure in schizophrenia: a systematic review and neurobiological interpretation. *J Psychiatry Neurosci*. Nov;38(6):366-80. 2013.

JANG MA, Kim BC, Ki CS, Lee SY, Kim JW, Choi TY, Lee DH, Song J, Lee YW, Park HD. Identification of PRODH mutations in Korean neonates with type I hyperprolinemia. *Ann Clin Lab Sci*. Winter;43(1):31-6. 2013.

JULIBONI R. V. Esquizofrenia Paranide: Relato de Caso e Revisão da Leitura. *Revista Científica da FMC - Vol. 3, n° 2*, 2008.

Junior B. & coll. Cognitive impairment in schizophrenia: an update. *Revista de Psiquiatria do RS*. 2010.

KAPLAN, H. I.; SADOCK, B. J. *Compendia de Psiquiatria*. 9ª ed., Porto Alegre: Editora Artmed, 2007.

KAPLAN, H. I.; SADOCK, B. J. *Manual de Psiquiatria Clínica*. 5ª ed., Porto Alegre: Editora Artmed, 2012.

KARAM, Caline S. BALLON, Jacob S. , BIVENS, Nancy M. , Signaling pathways in schizophrenia: emerging targets and therapeutic strategies. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2010.

KEMPF, L.; Nicodemus, K. K.; Kolachana, B., et al. Functional polymorphisms in prodh are associated with risk and protection for schizophrenia and fronto-striatal structure and function. *PLoS Genet*, 4(11): e1000252. 2008.

KIM JH, Park BL, Pasaje CF, Bae JS, Park CS, Cha B, Kim BJ, Kim JW, Choi WH, Shin TM, Choi IG, Hwang J, Woo SI, Shin HD. Lack of association between proline dehydrogenase (oxidase) 1 polymorphisms and schizophrenia in a Korean population. *Psychiatr Genet*. Jun;22(3):153-4. 2012

KRAWCZAK, M.; Reiss, J.; Cooper, D. N. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet*, 90(1-2): 41-54. 1992.

LANDER, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822): 860-921. 2001.

LIMA, I.C.S.; VELOSO, C.L. A percepção dos cuidados sobre a assistência de enfermeiro no Centro de Atenção Psicossocial II. *Rev. Interdisciplinar UNINOVA FAPI, Teresina*, v.5, n4, p.9- 12, OUT-DEZ. 2012. Disponível em: <Uninovajari.edu.br/sistemas/revistainterdisciplinar/pdf/revista_vol5n4.pdf#.page=9> Acesso em: 08 out 2014.

LIU, H.; Abecasis, G. R.; Heath, S. C., et al. Genetic variation in the 22q11 locus and susceptibility to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(26): 16859-64. 2002.34

LOCH. Alexandre A. & : Epistasis between COMT Val158Met and DRD3 Ser9Gly polymorphisms and cognitive function in schizophrenia: genetic influence on dopamine transmission. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2015;37:235–241. 2014.

MACEDO, D.S. Esquizofrenia: uma doença inflamatória J. bras. Psiquiatr. vol.59 no.1, 2010.

MICHELOTTI A, Liguori R, Toriello M, D'Antò V, Vitale D, Castaldo G, Sacchetti L.Catechol- O-Methyltransferase (COMT) Gene Polymorphisms as Risk Factor in Temporomandibular Disorders Patients From Southern Italy. *Clin J Pain*. Feb;30(2):129-33. 2014.

NARDI, A. E.; QUEVEDO, J.; SILVA, A. G.(Org.). Esquizofrenia: teoria e clínica. Porto Alegre: Artmed, 2015. 260 p.

OTA VK, Belangero SI, Gadelha A, Bellucco FT, Christofolini DM, Mancini TI, Ribeiro-dos- Santos AK, Santos SE, Mari Jde J, Bressan RA, Melaragno MI, Smith Mde A. The UFD1L rs5992403 polymorphism is associated with age at onset of schizophrenia. *J Psychiatr Res*. Nov;44(15):1113-5. 2010.

PHANG, J.; Hu, C.; Valle, D. Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editors. New York: McGraw Hill. 1821-1838. 2001.

PHILLIPS, M. S.; Lawrence, R.; Sachidanandam, R., et al. Chromosome-wide distribution of haplotype blocks and the role of recombination hot spots. *Nat Genet*, 33(3) 382-7. 2003.

RANGEL, B. & Santos, L. Adriana dos. Genetic Aspects of Schizophrenia a Review of Literature. *UNINGÁ Review, (Out- Dez) Vol.16,n.3.,pp.27-31*. 2013.

RAUX, G.; Bumsel, E.; Hecketsweiler, B., et al. Involvement of hyperprolinemia in cognitive and psychiatric features of the 22q11 deletion syndrome. *Hum Mol Genet*, 16(1): 83-91. 2007.

SACHIDANANDAM, R.; Weissman, D.; Schmidt, S. C., et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409(6822): 928-33. 2001.

SCHNEIDER M, Van der Linden M, Menghetti S, Glaser B, Debbané M, Eliez S. Predominant negative symptoms in 22q11.2 deletion syndrome and their associations with cognitive functioning and functional outcome. *J Psychiatr Res*. Jan;48(1):86-93. 2014.

SHIFMAN, S.; Bronstein, M.; Sternfeld, M., et al. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am J Hum Genet*, 71(6): 1296-302. 2002.

SHIN HD, Park BL, Bae JS, Park TJ, Chun JY, Park CS, Sohn JW, Kim BJ, Kang YH, Kim JW, Kim KH, Shin TM, Woo SI. Association of ZDHHC8 polymorphisms with smooth pursuit eye movement abnormality. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. Sep;153B(6):1167-72. 2010.

SILVA, Regina Cláudia Barbosa da, Esquizofrenia: Uma Revisão - Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, 2006.

SMITH CT, Swift-Scanlan T, Boettiger CA. Genetic Polymorphisms Regulating Dopamine Signaling in the Frontal Cortex Interact to Affect Target Detection under High Working Memory Load. *J Cogn Neurosci*. Feb;26(2):395-407. 2014.

SOUZA Renan Pedra de. Farmacogenética da Esquizofrenia – Tese. (Doutorado em Farmacologia Bioquímica e Molecular). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, 2008.

SQUARCIONE C, Torti MC, Di Fabio F, Biondi M. 22q11 deletion syndrome: a review of the neuropsychiatric features and their neurobiological basis. *Neuropsychiatr Dis Treat*. Dec 9:1873- 1884. 2013.

VALIENTE A, Lafuente A, Bernardo M. Systematic review of the Genomewide, Association Studies (GWAS) in schizophrenia. *Rev Psiquiatr Salud Ment*. 2011.

WILLIAMS NM. Molecular mechanisms in 22q11 deletion syndrome. *Schizophr Bull*. Sep;37(5):882-9. 2011.

WRIGHT GE, Niehaus DJ, van der Merwe L, Koen L, Korkie LJ, Kinnear CJ, Drögemöller BI, Warnich L. Association of MB-COMT polymorphisms with schizophrenia-susceptibility and symptom severity in an African cohort. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. Oct 1;39(1):163-9. 2012.

XIE, L.; Ye, L.; Ju, G., et al. A family- and population-based study of the UFD1L gene for schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B(7): 1076-9. 2008.

ZANATTA, Geancarlo, Analise da ligação dos Antipsicóticos Eticloprida, Haloperidol e Risperidona, no receptor Dopaminérgico D3 : Uma abordagem por Ancoramento Molecular, Bioquímica Quântica e Dinâmica Molecular - Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, 2014.

ZARCHI O, Carmel M, Avni C, Attias J, Frisch A, Michaelovsky E, Patya M, Green T, Weinberger R, Weizman A, Gothelf D. Schizophrenia-like neurophysiological abnormalities in 22q11.2 deletion syndrome and their association to COMT and PRODH genotypes. *J Psychiatr Res. Nov*;47(11):1623-9. 2013.

ANEXOS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

PROJETO: Análise de variações genômicas em genes da região cromossômica 22q11.2 em pacientes esquizofrênicos do Estado do Pará

A Universidade Federal do Pará está desenvolvendo uma pesquisa que permitirá avaliar as possíveis alterações genéticas em pacientes acometidos de Esquizofrenia (ESQ), internados na Clínica Psiquiátrica da Fundação Hospital de Clínicas Gaspar Viana no Estado do Pará. Esta pesquisa será realizada pelo monitoramento dos pacientes através da identificação de possíveis alterações genéticas em amostra de sangue periférico. Você está sendo admitido(a) nesta pesquisa, e para tal, há a necessidade da remoção de material biológico. Parte do material retirado será encaminhado para exames laboratoriais, necessários para a investigação. O restante do material não utilizado será armazenado para novos exames, se necessário. A obtenção da amostra de sangue para a pesquisa não implicará em riscos adicionais para sua saúde. A amostra de material biológico será identificada no laboratório por um código que preserva sua privacidade e identidade. A inclusão dos resultados em publicação científica garantirá o anonimato do voluntário. É necessário esclarecê-lo (a) que não existem benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu atendimento ou tratamento. Caso você tenha alguma dúvida sobre este documento ou em relação à pesquisa, por gentileza, entre em contato com a Prof. Rommel Burbano, pelo telefone 3211-1727 ou 8836 4667.

Uma cópia deste documento será arquivada em seu prontuário e, se desejar, uma cópia lhe será fornecida.

Leopoldo Silva de Moraes
Pesquisador
Trav. Guerra passos, 1093
8344 2998

Rommel Mario Rodriguez Burbano
Orientador
Trav. São Pedro 638, apto 1203,
Fone: 8836-4667.

Giovanny Rebouças Pinto
Co-orientador
Campus Reis Velloso.
Av. São Sebastião Reis
Velloso, Parnaíba, PI

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, ____/____/____

Sujeito que colheu o TCLE

Sujeito da pesquisa ou do responsável



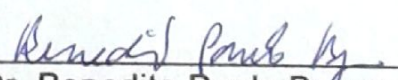
Belém, 25 de setembro de 2008

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Protocolo: Nº 060/2008- CEP/FHCGV
2. Projeto de Pesquisa: "ESTUDO CITOGENÉTICO EM PACIENTES PORTADORES DE ESQUIZOFRENIA DO ESTADO DO PARÁ"
3. Pesquisador Responsável: Leopoldo Silva de Moraes
4. Instituição/Unidade: Fundação Hospital de Clínicas Gaspar Vianna
5. Data de Entrada: 05/09/2008
6. Data do Parecer: 25/09/2008

PARECER: O Comitê de Ética em Pesquisa da FHCGV analisou o Projeto supra-citado e, conforme Parecer datado de 25/09/2008 emitido por este CEP, verificou que foram atendidas todas as adequações recomendadas de acordo com as normas da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO**



Prof. Dr. Benedito Paulo Bezerra
Coordenador do CEP/FHCGV

GEP/FHCGV

Tv. Alferes Costas s/n – Pedreira – Belém (PA) – CEP: 66087-660

Fone/Fax: (091)3276-1770

E-mail: gepfhcgv@yahoo.com.br